

BEST AVAILABLE COPY

AMPLIFICATION AND OTHER ENZYMATIC REACTIONS PERFORMED ON NUCLEIC ACID ARRAYS

Publication number: JP2001511361T

Publication date: 2001-08-14

Inventor:

Applicant:

Classification:





- international: C12N15/09; B01J19/00; C12Q1/68; C12Q3/00; G01N33/53; G01N35/00; C12N15/09; B01J19/00; C12Q1/68; C12Q3/00; G01N33/53; G01N35/00; (IPC1-7): C12Q1/68; C12N15/09; C12Q3/00

- european: B01J19/00C; C12Q1/68B6; C12Q1/68B10A; C12Q1/68D; C12Q1/68D2G

Application number: JP20000504288T 19980721

Priority number(s): US19970053428P 19970722; WO1998US15042 19980721

Also published as:

 WO9905321 (A1)
 EP1000175 (A0)
 CA2297661 (A1)
 AU729134 (B2)

Report a data error here

Abstract not available for JP2001511361T

Abstract of corresponding document: **WO9905321**

The present invention provides methods and an apparatus for performing amplification and other enzymatic reactions on nucleic acid molecules that have been printed onto a solid substrate, such as a silicon wafer or glass slide.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-511361
(P2001-511361A)

(43) 公表日 平成13年 8 月14日 (2001. 8. 14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	メモ (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	Z 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		3/00	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 3/00		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 55 頁)

(21) 出願番号 特願2000-504288(P2000-504288)
 (86) (22) 出願日 平成10年 7 月21日 (1998. 7. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年 1 月19日 (2000. 1. 19)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 1 5 0 4 2
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 0 5 3 2 1
 (87) 国際公開日 平成11年 2 月 4 日 (1999. 2. 4)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 5 3 , 4 2 8
 (32) 優先日 平成 9 年 7 月22日 (1997. 7. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ラビジーン, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ワシントン 98021, ポ
 ーセル, スイート 200, 220ティーエイ
 チ ストリート サウスイースト 1725
 (72) 発明者 バン ニース, ジェフリー
 アメリカ合衆国 ワシントン 98125,
 シアトル, 49ティーエイチ アベニュー
 ノースイースト 10020
 (72) 発明者 タボーン, ジョン シー,
 アメリカ合衆国 ワシントン 98011,
 ポセル, ノースイースト 166ティーエ
 イチ プレイス 12117
 (74) 代理人 弁理士 大塩 竹志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸アレイ上で行われる増幅および他の酵素反応

(57) 【要約】

本発明は、固体基板、例えばシリコンウエハまたはガラ
 ススライド上にプリントされた核酸分子について、増幅
 および他の酵素反応を実施するための方法および装置を
 提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 鋳型から核酸分子を増幅する方法であって、以下の工程：

(a) 固体基板上の一本鎖核酸鋳型を、該鋳型にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーおよびDNAポリメラーゼを含有する溶液と混合する工程であって、該混合する工程は該基板上の個別の領域で生じ、そして該溶液は該個別の領域に残存する、工程；

(b) 該鋳型に対する相補鎖を合成し、二重鎖を形成する工程；

(c) 該二重鎖を変性させる工程；および

(d) 該鋳型に対する相補鎖を合成し、そこから核酸分子を増幅する工程であって、

ここで、混合する工程、合成する工程、および変性する工程は露点で行われる、工程を包含する、方法。

【請求項2】 鋳型から核酸分子を増幅する方法であって、以下の工程：

(a) 固体基板上の一本鎖核酸鋳型を、該鋳型にハイブリダイズする第一のオリゴヌクレオチドプライマー、該鋳型の相補鎖にハイブリダイズする第二のオリゴヌクレオチドプライマー、およびDNAポリメラーゼを含有する溶液と混合する工程であって、該混合する工程は該基板上の個別の領域で生じ、そして該溶液は該個別の領域に残存する、工程；

(b) 該鋳型に対する相補鎖を合成し、二重鎖を形成する工程；

(c) 該二重鎖を変性させる工程；および

(d) 該鋳型および該鋳型の該相補鎖に対する相補鎖を合成し、そこから核酸分子を増幅する工程であって、

ここで、混合する工程、合成する工程、および変性する工程は露点で行われる、工程を包含する、方法。

【請求項3】 工程(c)および(d)が複数回行われる、請求項1または請求項2のいずれかに記載の方法。

【請求項4】 工程(c)および(d)が約10～約25回行われる、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記溶液が粘度を与える化合物を含む、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項21】 前記オリゴヌクレオチドプライマーの対が各々異なる配列を有する、請求項2に記載の方法。

【請求項22】 前記鋳型が混合する工程より前に前記アレイ全体に様に適用される、請求項1または請求項2のいずれかに記載の方法。

【請求項23】 前記鋳型が前記基板上の各個別の領域に個別に適用される、請求項1または請求項2のいずれかに記載の方法。

【請求項24】 前記適用する工程がスプリングブロープを使用して行われる、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 装置を使用して前記露点を制御する、請求項1または請求項2のいずれかに記載の方法。

【請求項26】 鋳型から核酸分子を合成する方法であって、以下の工程：

(a) 固体基板上の一本鎖核酸鋳型を、該鋳型にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーおよびDNAポリメラーゼを含有する溶液と混合する工程であって、該混合する工程はアレイの個別の領域で生じ、該溶液は該個別の領域に残存する工程；および

(b) 該鋳型に対する相補鎖を合成して二重鎖を形成する工程であって、

ここで、混合する工程および合成は露点で行われ、

露点は、加圧され得る容器；加熱デバイス；圧力を生成する手段；および飽和蒸気を生成する手段、を備える装置により達成され、

該加熱デバイス、圧力生成手段、および蒸気生成手段は制御可能である、工程を包含する、方法。

【請求項27】 核酸分子中の1塩基変化を検出する方法であって、以下の工程：

(a) 固体基板上の一本鎖核酸分子を、該核酸分子にハイブリダイズする第一および第二のオリゴヌクレオチドならびにDNAリガーゼを含有する溶液と混合する工程であって、該混合する工程はアレイの個別の領域で生じ、該溶液は該個別の領域に残存する、工程；および

(b) 連結産物を検出する工程であって、

項2のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 前記化合物がグリセロールまたは糖である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 グリセロールが約30～約100%の濃度で存在する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 グリセロールが約20～約70%の濃度で存在する、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 前記DNAポリメラーゼが熱安定性ポリメラーゼである、請求項1または請求項2のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 合成および変性が異なる温度で行われる、請求項1または請求項2のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 前記二重鎖を検出する工程をさらに含む、請求項1または請求項2のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 前記オリゴヌクレオチドプライマーが標識されている、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記標識が蛍光分子である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記標識が非蛍光分光測定法または電位差測定法により検出可能なタグである、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 前記タグの検出が質量分析法、赤外分光測定法、紫外分光測定法、または電位差電流測定法による、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記第一もしくは第二または両方のオリゴヌクレオチドプライマーの配列およびタグが各鋳型について異なる、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 前記増幅した核酸が検出の前にプールされる、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記アレイが、シリコンウエハまたはホウケイ酸スライドを含む固体基板上にある、請求項1または請求項2のいずれかに記載の方法。

【請求項19】 前記鋳型が前記固体基板上に共有結合的に付着される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記付着がポリエチレンイミン結合を介する、請求項19

ここで、該核酸分子上の接合部塩基で1塩基変化がある場合、該第一および第二のオリゴヌクレオチドは連結せず、

ここで、混合する工程は露点で行われ、

露点は、加圧され得る容器；加熱デバイス；圧力を生成する手段；および飽和蒸気を生成する手段、を備える装置により達成され、

該加熱デバイス、圧力生成手段、および蒸気生成手段は制御可能である、工程を包含する、方法。

【請求項28】 単一ヌクレオチド伸長アッセイを行う方法であって、以下の工程：

(a) 固体基板上のオリゴヌクレオチドを、該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする一本鎖核酸分子、単一ヌクレオチド、およびDNAポリメラーゼを含有する溶液と混合する工程であって、該混合する工程は該基板の個別の領域で生じ、該溶液は該個別の領域に残存する、工程；および

(b) 該オリゴヌクレオチドの伸長産物を検出する工程であって；

ここで、該オリゴヌクレオチドは、該単一ヌクレオチドが、該ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドに隣接するヌクレオチドに相補的である場合にのみ、伸長され、

混合する工程は露点で行われ、

露点は、加圧され得る容器；加熱デバイス；圧力を生成する手段；および飽和蒸気を生成する手段、を備える装置によって達成され、

該加熱デバイス、圧力生成手段、および蒸気生成手段は制御可能である、工程を包含する、方法。

【請求項29】 遺伝子型決定するためのキットであって、実質的に平坦である表面を有する固体基板であって、該表面が標識オリゴヌクレオチドプライマー対のアレイを支持する、固体基板を備える、キット。

【請求項30】 核酸鋳型をさらに備える、請求項29に記載のキット。

【請求項31】 粘性溶液をさらに備える、請求項29に記載のキット。

【請求項32】 約4℃～約95℃の範囲内の温度サイクリングの間、チャンバーを露点に維持するための機器であって、以下：

- (a) 加熱および冷却ブロック；
- (b) 該ブロックを覆うことが可能な気密チャンパー；
- (c) 該チャンパー内の圧力を調整する手段；および
- (d) 該チャンパー内に水蒸気を注入する手段；

を備える、機器。

【請求項33】 約4℃〜約95℃の範囲内での温度サイクリングの間、チャンパーを露点に維持するための機器であって、以下：

- (a) 加熱および冷却ブロックを覆うことが可能な気密チャンパー；
- (b) 該チャンパーと該ブロックとの間のシール；
- (c) 該チャンパー内の圧力を調整する手段；および
- (d) 該チャンパー内に水蒸気を注入する手段；

を備える、機器。

【請求項34】 前記圧力調整手段がピストンである、請求項32または請求項33のいずれかに記載の機器。

【請求項35】 前記ピストンがコンピューター制御される、請求項34に記載の機器。

【請求項36】 液滴を容積で測定し、そして前記圧力を制御するセンサーをさらに備える、請求項32または請求項33のいずれかに記載の機器。

【請求項37】 前記ブロック温度がコンピューター制御される、請求項32に記載の機器。

【0004】

特に、核酸の増幅、若しくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびその多くの改変物により、非常に異なる多くの生物学的課題への広い適用が見出されたが、ODNが固定化される形式に移動することは容易ではない。その標準的形式において、PCRはその商業的利用にたいして2つの主な制限がある：試薬のコストおよびそのプロセスを自動化する能力。試薬コスト、特にDNAポリメラーゼは、各反応の総容量が減少すれば、低くなり得る。ロボット工学で制御したピンツールを使用する、少量の試薬をアレイ化するのに正確かつ信頼性のある手段は、この反応を小型化する。増幅をアレイ形式に移すことに対するさらなる障害としては、加熱および冷却サイクルの間の、エバポレーションを防止すること、およびこのアレイ上の反応物の拡散および併合を防止することが挙げられる。

【0005】

本発明は、構成成分を固定化する必要なしに、アレイ形式で増幅および他の酵素反応を行うための方法および組成物を開示し、他の関連する利点をさらに提供する。

【0006】

（発明の要旨）

本発明の1つの局面では、鋳型から核酸分子を増幅する方法であって、(a) 固体基板上の一鎖核酸鋳型を、この鋳型にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーおよびDNAポリメラーゼを含む溶液を用いて、混合する工程であって、この混合する工程がこの基板上の個別の領域で生じ、この溶液が個別の領域に残存する、工程；(b) 上記鋳型に対する相補鎖を合成して、二重鎖を形成する工程；(c) この二重鎖を変性させる工程；および(d) 上記鋳型に対する相補鎖を合成し、これにより核酸分子を増幅する工程；ここで混合する工程、合成する工程、および変性する工程は露点で行われる、工程を含む方法が提供される。上記固体基板はシリコンウエハまたはガラススライドであり得る。上記の鋳型は上記の固体基板に共有結合的に付着し得るか、または上記基板の表面に沈着され得る。上記鋳型は混合する前にアレイ全体に均様に適用され得るか、または上記基板上の各個別の領域に個別に適用され得る。個別に適用する場合、好ま

【発明の詳細な説明】

【0001】

（技術分野）

本発明は一般的に、固体基板上にアレイ化される核酸について行われる酵素反応に関し、詳細には、アレイ化された核酸の増幅に関する。

【0002】

（発明の背景）

多くの試料の平行試験を容易にするために、生物学的因子の複製アレイを使用してきた。例えば、異なる増殖表現型についての多くの独立コロニーを迅速にスクリーニングする手段として長い間、無菌ピロッドクロスおよびピストンリング装置を使用して、それぞれ異なる増殖増地を含む寒天プレートに対して、細菌および酵母コロニーの複製物を作製してきた（LederbergおよびLederberg, J. Bacteriol. 63:399, 1952）。同様に、96ウェルマイクロタイタープレートを使用して、容易に接近される様式で、多くの、例えば、細胞株、組換えDNAライブラリーを表すウィルス単離体、またはモノクローナル抗体細胞株を組織化および貯蔵する。

【0003】

大規模ゲノム計画の出現および分子診断の使用の増加が、核酸をスクリーニングする大容量処理能力方法の開発を必要としてきた。最近、あり得るヌクレオチド配列の全てまたは全てのうちのサブセットを表す、ガラスまたはケイ素表面に結合した短いオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の大きなアレイを合成する方法が、開発された（MaskosおよびSouthern, Nucl. Acids Res. 20:1675, 1992）。これらのODNアレイは、ハイブリダイゼーション（Southernら, Genomics 13:1008, 1992; Drmanacら, Science 260:1649, 1993）によるDNA配列解析を行い、発現プロファイルを決定し、変異をスクリーニングするためなどに利用されてきた。これらの使用の全てにおいて、ODNは基板の表面に共有結合的に付着される。しかし、幾つかの有用なスクリーニング技術およびアッセイは、ODNが固定されている形式に容易には適合されない。

しくはこの適用はスプリングプローブ（spring probe）を使用して行われる。最も好ましい実施態様において、装置を使用して上記露点を制御する。

【0007】

関連した局面では、増幅方法には、上記鋳型とハイブリダイズする第一のオリゴヌクレオチドプライマー、上記鋳型の相補鎖にハイブリダイズする第二のオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、そして合成し、二重鎖を変性させ；そして、上記鋳型およびこの鋳型の相補鎖に対する相補鎖を合成した後、これにより核酸分子が増幅される。

【0008】

好ましい実施態様において、上記変性および合成工程は複数回行われる。他の好ましい実施態様において、上記溶液は、粘度を与える化合物、例えばグリセロールまたは糖を含む。他の好ましい実施態様において、上記DNAポリメラーゼは熱安定性ポリメラーゼであり、そして合成および変性は、異なる温度で行われる。

【0009】

さらに他の好ましい実施態様において、上記方法は上記二重鎖を検出する工程をさらに含む。最も好ましくは、上記オリゴヌクレオチドプライマーは、非蛍光分光測定法または電位差測定法により、好ましくは質量分析法、赤外分光測定法、紫外分光測定法、または電位差電流測定法により検出可能であるタグで標識される。

【0010】

別の局面では、鋳型から核酸分子を合成する方法であって、(a) 固体基板上の一鎖核酸鋳型を、この鋳型とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーおよびDNAポリメラーゼを含む溶液と混合する工程であって、この混合する工程はアレイの個別の領域で生じ、そしてこの溶液は個別の領域に残存する、工程；および(b) 上記鋳型に対する相補鎖を合成して、二重鎖を形成する工程であって、ここで混合する工程および合成は露点で行われ、露点は、加圧され得る容器；加熱デバイス；圧力を生成する手段；および飽和蒸気を生成する手

段を備える装置によって維持または造成され、この加熱デバイス、圧力生成手段、および蒸気生成手段は制御可能である、工程を含む方法が提供される。

【0011】

さらに別の局面において、核酸分子中の1塩基変化を検出する方法であって、(a) 固体基板上の一本鎖核酸分子を、この核酸分子にハイブリダイズする第一および第二のオリゴヌクレオチドならびにDNAリガーゼを含有する溶液と混合する工程であって、この混合する工程はアレイの個別の領域で生じ、この溶液は個別の領域に残存する、工程；および(b) 連結産物を検出する工程；ここで上記第一および第二のオリゴヌクレオチドは、上記核酸分子上の接合部塩基で1塩基変化がある場合、連結せず、混合する工程は露点で行われる、工程を含む方法が提供される。

【0012】

さらに別の局面において、単一ヌクレオチド伸長アッセイを実施する方法であって、(a) 固体基板上のオリゴヌクレオチドを、このオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする一本鎖核酸分子、単一ヌクレオチド、およびDNAポリメラーゼを含有する溶液と混合する工程であって、この混合する工程は上記基板の個別の領域で生じ、上記溶液は個別の領域に残存する、工程；および(b) 上記オリゴヌクレオチドの伸長産物を検出する工程；ここで、上記オリゴヌクレオチドは、上記単一ヌクレオチドが、上記ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドに隣接するヌクレオチドに相補性である場合のみ伸長され、混合する工程は露点で行われる、工程を含む方法が提供される。

【0013】

他の局面において、本発明は、遺伝子型決定(genotyping)をするためのキットであって、標識されたオリゴヌクレオチドプライマー対のアレイを含有する固体基板を備えるキットを提供する。好ましい実施態様において、このキットは核酸鋳型および粘性溶液をさらに備える。

【0014】

本発明のこれらおよび他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照すれば明白となる。さらに、様々な参考文献が以下に示され、これはより詳細な

の全体が本明細書中に参考として採用される)に開示された技術に従って調製され得る。

【0018】

本発明の方法およびキットと共に使用され得る生体分子アレイは、1997年7月22日出願されたとおり、「Polyethylenimine-Based Biomolecule Arrays」と題された米国仮特許出願第60/053,352号および同様に題され、これと同日出願された米国非仮特許出願第()号(共にその全体が本明細書中に参考として採用される)に開示された技術に従って調製され得る。

【0019】

1997年7月22日出願したとおり「Computer Method and System for Correlating Data」と題された米国仮特許出願第60/053,429号および同様に題され、これと同日出願された米国非仮特許出願第()号(共にその全体が本明細書中に参考として採用される)に開示された、データを相関させることに関するコンピュータシステムおよび方法は、本明細書に記載のとおり核酸アレイ上で行われる増幅および他の酵素反応と組合せて使用され得る。

【0020】

(発明の詳細な説明)

上述のとおり、本発明は、鋳型から核酸分子を増幅するための方法および装置、ならびに核酸分子上で酵素アッセイを行うための方法および装置を提供する。これらの方法は一般的に、本明細書に記載のとおり作製された核酸分子のアレイ上で行われる。本発明において、これらの方法は露点を制御する装置内で行われる。

【0021】

(1. 固体基板への鋳型の適用)

(A. 基板調製)

アレイの基板は適切な材料から調製される。この基板は好ましくは剛直であり、そして好ましくは實質的に平坦である表面を有する。幾つかの実施態様におい

ては、特定の手順または組成物(例えば、プラスミドなど)を記述しており、従ってその全体が参考として採用される。

【0015】

本発明の方法およびキットは、タグ化生体分子、例えば、切断可能なタグに共有結合したオリゴヌクレオチドを含み得る。例示的なタグ化生体分子、およびこれを使用し得るアッセイが、各々1997年1月22日出願した米国特許出願第08/786,835号；同第08/786,834号および同第08/787,521号に、ならびに各々1997年7月22日出願した出願第08/898,180号；同第08/898,564号；および同第08/898,501号を有する3つの米国一部継続特許出願、ならびに国際公開第WO 97/27331号；同第WO 97/27325号；および同第WO 97/27327号に記載される。これら6つの米国特許出願および3つの国際公開は各々、これにより、本明細書中にその全体が参考として採用される。

【0016】

本発明の方法およびキットは、エレメント(または「第一の領域」)内に1つより多くのオリゴヌクレオチド配列を含むアレイと共に使用され得る。エレメント内に1つより多くのオリゴヌクレオチド配列を含む生体分子アレイ、およびその使用は、1997年7月22日出願されたとおり、「Multiple Functionalities Within An Array Element And Uses Thereof」と題された米国仮特許出願第60/053,436号および同様に題され、これと同日出願された米国非仮特許出願第()号(共にその全体が本明細書中に参考として採用される)に記載される。

【0017】

本発明の方法およびキットと共に使用され得る生体分子アレイは、1997年7月22日出願されたとおり、「Apparatus And Method For Arraying Solution Onto A Solid Support」と題された米国仮特許出願第60/053,435号および同様に題され、これと同日出願された米国非仮特許出願第()号(共にそ

て、領域を示すために、この表面は隆起したリジッド(raised rigid)を有し得る。代表的な基板はシリコンウエハおよびホウケイ酸スライド(例えば、顕微鏡ガラススライド)であるが、当該分野で既知の他の材料で代用され得る。特に有用な固体支持体の例はシリコンウエハであり、これは、半導体(semiconductor)の構築において電子工業産業において代表的に使用される。このウエハは、1つの面が極めて研磨加工され反射性であり、そして種々のリンカー、例えばシラン化学を使用するポリ(エチレンジイミン)で容易にコートされ得る。ウエハは、WaferNet, San Jose, CAのような会社から市販されている。

【0022】

核酸分子または他の生体高分子、例えばペプチドはインサイチュ、すなわち固体基板上で合成されるか、その他の場所で合成され、この基板に適用されるかのいずれかであり得る。あるいは、オリゴヌクレオチドが既にアレイ上に存在する基板は購入できる(例えば、Affymetrix, Palo Alto, CA)。固体基板、例えばシリコンウエハ上で核酸を合成する多くの適切な方法は容易に入手可能である。これらの方法は、標準のプロトコル、例えばホスホoramidite化学を頼みにしてオリゴヌクレオチドを合成する。核酸およびペプチドもまた、市販の機械を使用する自動化した様式で合成され得る。好ましい方法は、上記核酸分子を調製し、これらを上記基板に適用することである。特定の実施態様において、上記分子は、上記基板に共有結合的に付着している。好ましい実施態様において、上記核酸分子は上記固体基板上に沈着され、共有結合的には付着されない。

【0023】

特定の実施態様において、上記基板の表面はオリゴヌクレオチドのために調製される。この表面は、例えば、この疎水性を増加もしくは減少させる化学物質でコーティングすること、または上記核酸分子もしくは他の重合配列の共有結合を許容する化学物質でコーティングすることにより調製され得る。幾つかの化学的なコーティングは、疎水性を変化させると共に、共有結合を許容し得る。固体基板上の疎水性は、当該分野で公知のシラン処理または他の処理により容易に増加

され得る。共有結合を許容する化学物質は、一般的にリンカーと呼ばれる。これらのリンカー分子は、上記基板の表面に付着し、生体分子と反応する官能基を含む。多くのこのようなリンカーは容易に入手できる。例えば、固体支持体は、感光保護した (photolabile-protected) 水酸基 (米国特許第5,412,087号; 同第5,571,639号; 同第5,593,839号を参照のこと)、アルコキシまたは脂肪族で誘導体化した水酸基 (米国特許第5,436,327号)、または他の化学物質 (例えば、米国特許第5,445,934号; EP特許第EP-B1-0,373,203号; 米国特許第5,474,796号; 米国特許第5,202,231号を参照のこと) を用いて改変される。

[0024]

疎水性を減少させると共に、リンカーを提供する好ましいコーティングは、ポリ (エチレンイミン) である。さらに、ポリ (エチレンイミン) (PEI) でコーティングした固体基板はまた長い貯蔵寿命安定性という付加された利点を有する。ポリマー、例えばポリ (エチレンイミン) でのシリコンウエハおよびガラススライドのコーティングは、社内で、または Cel Associates (Houston, Texas) のような会社を通して実施され得る。ガラススライドはまた、反射性材料でコーティングされ得るか、またはシラン化学を使用して PEI でコーティングされ得る。この PEI コーティングは、一本鎖もしくは二本鎖のオリゴヌクレオチド、一本鎖もしくは二本鎖の長い DNA 分子もしくはフラグメント、または任意の他のアミン含有生体分子の、上記固体支持体への共有結合的付着を許容する。オリゴヌクレオチドはヘキシルアミン修飾を使用して 5' で共有結合的に付着し得、この修飾は上記オリゴヌクレオチドの 5' 末端に一級アミンを配置する。次に、上記オリゴヌクレオチド上の 5' アミンは、架橋剤と反応し得、その結果、このオリゴヌクレオチドは、上記固体支持体上にコーティングされたポリマーに共有結合的に付着される。

[0025]

任意の核酸型は、この核酸が一級アミンを含有する限りは、PEI でコーティングした表面に共有結合的に付着され得る。増幅産物 (例えば、PCR による)

されない。

[0028]

上記核酸または他のアミン含有ポリマーを共有結合的に付着させる場合、上記活性化ポリマーを、1~20時間、20~50℃で、好ましくは1時間25℃で、上記固体支持体と反応させる。次にこの固体支持体上の遊離アミンはキャッピング (cap) され、他の核酸の非特異的な付着が防止される。キャッピングは、上記固体支持体を70% m-ピロール (pyrrol) および0.1Mホウ酸Na中で、1~2.0M無水コハク酸、好ましくは1.0M無水コハク酸と、15分間~4時間、好ましくは25℃で30分間の反応時間で、反応させることにより達成される。次に上記固体支持体は、0.1~5Mグリシン (好ましくは0.2Mグリシン) を含有する、pH7~pH9の0.1~10.0Mホウ酸Na (好ましくはpH8.3の0.1Mホウ酸Na) 溶液中でインキュベートされ、次に界面活性剤含有溶液で洗浄される。このことは、上記PEI表面に共有結合し得る任意のジクロロトリアジンを経由してキャッピングする。好ましくは、上記固体支持体は、0.01M NaCl、0.05M EDTAおよび10mM Tris (pH8.0) 中で5分間、95℃にさらに加熱され、全ての非共有結合に付着する核酸が除去される。二本鎖核酸が固体基板上にプリントされる場合、この工程はまた、この二本鎖を一本鎖形態に変換 (変性) する。

[0029]

(B. 核酸分子を固体基板に適用する方法)

オリゴヌクレオチド、核酸分子、または他の生体高分子は固体基板上に「プリント」 (送達または適用) される。好ましい実施態様において、このポリマーは規則的なパターンまたはアレイにおいて適用される。他の好ましい実施態様において、このポリマーは上記固体基板の領域全体に適用され、乾燥させられ、その後追加のポリマー、緩衝液、酵素などがアレイパターンにおいて適用される。上記ポリマーは、例えば、10mM Tris、50mM NaCl、および5mM EDTAのように、界面活性剤なしで、ピペッター、ナイロンローラー、スタンプなどを使用して、緩衝塩溶液中で上記基板に適用され得る。

[0030]

は、5' ヘキシルアミン結合体化プライマーを使用することにより、一級アミンを含有するように改変され得る。アミン基は、アリル-dUTP (Sigma, St. Louis, MO) を使用するニックトランスレーションにより、増幅産物および他の核酸二重鎖に導入され得る。その上、アミンは、ポリメラーゼ、例えば、ターミナルトランスフェラーゼにより、または短いアミン含有オリゴヌクレオチドの連結により核酸に導入され得る。当該分野において公知の他の適切な方法が代用され得る。

[0026]

アミン基に適切な架橋剤は一般的に市販されている (例えば、Pierce, Rockford, IL を参照のこと)。代表的な架橋剤は、トリクロロトリアジン (塩化シアヌル) (Van Nessら, Nucleic Acids Res. 19:3345-3350, 1991) である。簡単に、過剰の塩化シアヌルが、0.01~1μg/ml、および好ましくは約0.1μg/mlの代表的なオリゴヌクレオチド濃度のオリゴヌクレオチド溶液 (例えば、アミンの10~1000倍モル過剰の塩化シアヌル) に添加される。この反応は、一般的な緩衝液、例えば、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、またはTris HClを7.0~9.0のpH範囲で使用して緩衝化される。好ましい緩衝液は、新しく調製されたpH8.3~pH8.5の0.2Mホウ酸Naである。10μlの塩化シアヌルの15mg/ml溶液が、添加され、1~12時間および好ましくは約1時間、一定に攪拌しながら反応させる。反応温度は、20~50℃の範囲であり得、好ましい反応温度は、25℃ (または周囲温度) である。

[0027]

塩化シアヌルが架橋剤として使用される場合、上記核酸を固体基板にプリントする前に過剰なクロスリンカーを除去する必要は無い。上記反応混合物中の過剰の塩化シアヌルは、上記核酸またはオリゴヌクレオチドの上記PEIコーティングした固体基板への共有結合的付着を妨害も競合もしない。なぜなら、上記固体基板上のアミンが、塩化シアヌル分子の数よりも過剰であるからである。好ましい実施態様において、架橋したオリゴヌクレオチドはプリントする工程の前に精製

種々のプリント方法が、アレイパターンにおいて、核酸、例えば、オリゴヌクレオチドまたはDNAフラグメントを固体基板に適用するために利用可能である。一般的なガイドラインに従って、この送達機構は、非常に少量の液体 (例えば、ナノリッター) を、互いに非常に近接している (例えば、25~500μmの中心間距離の) 小さい領域 (例えば10~200μmの直径ドット) に位置決めすることが可能でなければならない。好ましくはプリント技術は自動化できる。1つのこのような技術は複数のヘッドを使用するインクジェットプリントである。非常に微細なピペッターもまた使用され得る。プリントする好ましい手段は、本明細書に記載したとおりのスプリングブローブを使用している。

[0031]

試料のピックアップ、移動、および微小液滴付着は、親水性の表面を有する液体移動デバイスを使用する場合に、特にこのデバイスが改変されたスプリングブローブである場合に、非常に増強される。スプリングブローブは、このブローブの表面を改変するように作用する化学薬剤の使用を通して、または親水性物質でこのブローブをコーティングすることを通して親水性にされる。好ましい方法において、上記スプリングブローブのチップは、1,4-ジチオスレイトール、0.1Mホウ酸ナトリウムの25~200mM溶液中に、15分間~2時間浸漬される。ジチオスレイトールは、チオール金配位を通して金表面と反応し、このことは上記表面を本質的に水酸化し、上記表面を親水性にする。

[0032]

上記親水性表面は、上記スプリングブローブを溶液中に浸漬した場合、試料の均一なコーティングを促進する。戻つきブローブは、その親水性の性質により、上記ブローブ表面に汲み出された液体が一樣におよび一貫してロードされるようになる。グリセロールのような粘性増強化学物質を有する溶液は、親水性表面を使用して操作能力の改善を特に提供する。これらの溶液を用いると、液体の供給源から引き出された場合に、このグリセロールは上記ブローブに一樣に接触する。試料がその供給源から固体支持体へと移されたとき、上記ブローブの親水性表面は、移された上記試料を保持すること、および輸送の間にこの試料を無作為に滴下または流すことを防止することにより、液体操作で利益を受け続ける。スプ

リングブローブを有する試料が固体支持体と接触する場合、特に粘度増強溶液を含有する試料の場合、この試料はこのスプリングブローブのチップからこの固体支持体の表面に沈着される。スポットされる領域のサイズは一般的に、代表的な中心間距離は25〜500 μm で、10〜200 μm の範囲である。

[0033]

簡単に、代表的な手順において、上記核酸の溶液は、5%グリセロール中に一様に混合され、次に上記固体支持体にプリントされる。本発明の文脈では、上記生体高分子は、核酸分子またはタンパク質分子のいずれかであり得る。核酸を使用する場合、これらは、一本鎖もしくは二本鎖のDNA、一本鎖もしくは二本鎖のRNA、オリゴヌクレオチド、ハイブリッドDNA-RNA分子、または二重鎖、タンパク質骨格を有するPNA核酸などを含み得る。

[0034]

(11. 反応成分および条件)

上記のとおり、本発明は、固体基板上で核酸を増幅する方法、ならびに他の酵素反応を提供する。上記のとおり、この核酸はこの基板の表面に共有結合的に付着し得るか、または付着せずにこの基板上に沈着し得る。代表的には、この増幅のための鎖型は最初にプリントされ、増幅または他の酵素反応に必要な試薬は続いて添加される。

[0035]

(A. 試薬、緩衝液、補助因子など)

反応を受けるアレイの各領域は、上記鎖型核酸に加えて、オリゴヌクレオチドプライマー、ヌクレオチド、緩衝液、補助因子などを含むがこれに限定されない、適切な酵素、および任意の他の必要な成分を有する。例えば、増幅反応物は、鎖型、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド（例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP）、オリゴヌクレオチドプライマー、および2価のカチオン（通常は Mg^{++} ）を含有する緩衝液を含有する。

[0036]

増幅反応は、プライマー伸長（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号および同第4,800,159

周知である。

[0038]

さらに、上記反応物は、他の化学物質または成分を含有し得る（米国出願第08/7719,132号および同第60/026,621号、ならびにこれら2つの米国出願に対する優先権を主張する国際公開番号第WO 98/13527号を参照のこと（これら全てはその全体が本明細書中に引用される））。例えばハイボトロープ（hybotrope）は、オリゴヌクレオチドプライマーの鎖型へのアニーリングを改善するために添加され得る。ハイボトロープとは、標準の塩溶液（すなわち、0.165M NaCl）を参照した場合に、核酸二重鎖のエンタルピーを20%以上増加させる任意の化学物質を言う。溶液として、50%G+Cである18bpオリゴヌクレオチド二重鎖が15℃以下のヘリックスコイルトランジション（HCT）を有する場合、化学物質はハイボトロピック（hybotropic）な特性を有する。HCTは、80%の二重鎖が一本鎖である温度と、20%の二重鎖が一本鎖である温度との差である。次にアニーリング温度は識別温度であるべく選択される。識別温度は、ミスマッチ二重鎖と完全にマッチした二重鎖との間の検出可能な識別を可能にするハイブリダイゼーション反応を実行する温度である。

[0039]

好ましい実施態様において、上記反応は粘性溶液中で行われる。このような溶液は好ましくは、この露点を上昇させ（すなわち、蒸気圧を低下させる）、高い表面張力を有し、そしてプリント能力を改善する。この粘性溶液は、酵素反応を実質的に阻害してはならない。好ましくは、酵素活性は1%以下〜20%阻害される。粘度を増加させる適切な化合物としては、グリセロールおよび糖が挙げられる。好ましくは、グリセロールは20〜100%で、より好ましくは20〜70%で存在する。他の適切な化合物は、(a) この化合物の存在下で、酵素活性を決定する工程、および(b) 固体基板上で液滴を形成し、上記反応温度でインキュベートし、そして個別の液滴（領域）が残存することを観察する工程、により同定され得る。一般的に、上記基板表面が疎水性であればあるほど、溶液の粘度は低下し、そして上記基板表面が親水性であればあるほど、溶液の粘度はより

号、サイクリングブローブ技術、NASBAを参照のこと）、連結（LCR、連結連鎖反応）、RNA増幅（Lizardiら、Bio/Technology 6:1197,1988;Kramerら、Nature 339:401,1989;Lomeliら、Clin. Chem. 35:1826,1989;米国特許第3,786,600号を参照のこと）、ディファレンシャルディスプレイ（LiangおよびPardee、Science、257:967-971,1992;Liangら、Nucl. Acids Res.、22:5763-5757,1994）などに基づく。好ましくは、この増幅方法は、熱安定性DNAポリメラーゼ、例えばTaq DNAポリメラーゼ、Ventra（登録商標）DNAポリメラーゼ、Ventra（登録商標）（エキソ）DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼなどを用いるポリメラーゼ連鎖反応である。これらの酵素について、至適な緩衝液および2価のカチオンは周知である。オリゴヌクレオチドプライマーは、好ましくは平均のG+C含有量であり、非対合3'末端を有する。オリゴヌクレオチド配列はまた、増幅される領域に部分的に依存する。オリゴの設計、緩衝液濃度、およびカチオン濃度についての条件および考慮すべき事項は周知である（例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1995;Innisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990;Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1987を参照のこと）。上記ヌクレオチドは一般的に4つのデオキシヌクレオチド（dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP）であるがまた、誘導体またはまれな塩基を含み得る。

[0037]

本発明の文脈での他の酵素反応は、鎖型からの核酸分子の合成、核酸分子における1塩基変化を検出するためのオリゴヌクレオチド連結アッセイ、および単一ヌクレオチド伸長アッセイを含む。各々のこれらの方法について、適切な条件は

高くなる。

[0040]

(B:露点の維持のための装置)

上記の通り、反応は、露点で行われる。本明細書において使用する場合、露点とは、液滴のサイズが有意に変化しない温度範囲をいう。本明細書において記載するように、温度、圧力、および含水量を制御し得る装置は、露点を維持するために使用され得る。

[0041]

反応自体は、微小液滴からの水分のエバポレーションを防ぐ規定された含水量のレベルを伴う圧力下で行われる。これらの条件は、微小液滴からの水分のエバポレーションの速度と基板アレイを覆った空気からの微小液滴上への水分の凝集の速度との間の平衡状態が存在する場合に、達成される。この平衡が現実化する場合、空気は、アレイの平面表面に関して飽和しているとされる。水蒸気によって生じる圧力（Ps）は、反応の間において任意の所定の温度において維持されなければならない飽和蒸気圧である。飽和蒸気圧の大きさは、温度のみに依存して、そして上昇する温度にともなって迅速に上昇する。すなわち、熱サイクル増幅は、達成される温度の全てについて、本質的に露点において行われる。例えば、0℃において、飽和蒸気の絶対圧力は、0.0885psiであり、一方、100℃において、飽和蒸気の絶対圧力は、17.186psiである。従って、装置は、増幅または他の酵素反応の間、生じる温度サイクリングの全ての間に、露点を維持する能力を有するべきである。本質的に、飽和した清浄な蒸気が、「チャンバー」内に存在する。装置は、代表的には、固体支持体、制御可能な加熱デバイス、圧力を生成する手段、および飽和蒸気を生成する手段を含有する圧力チャンバーから、構成される。全てのパラメータは、好ましくは、コンピュータによって制御可能である。他の実施態様において、装置は、圧力を生成する手段、飽和蒸気を生成する手段、ならびにこのチャンバーが制御可能な加熱および冷却ブロック（市販されているようなもの）上にシールされるようなシールを有するチャンバーである。このモジュール構成の装置は、種々のサイズの加熱および冷却ブロックの型式に適合するように設計される（例えば、96ウェルブ

レートサイズから、顕微鏡スライドまで)。

【0042】

好ましい実施態様において、および図5に関して、この発明は、加熱および冷却ブロック101を提供し、ブロック上にカバーガラス102が位置し、そしてカバーガラスは、サンプル液滴の別個の領域103を含む。そのブロックは気密性カバー104に入れられ、このカバーはチャンバーを形成し、そのチャンバーは、内部圧を調節するためのピストン105、露点を測定するセンサー106、および水蒸気の供給源107を有する。

【0043】

本発明の好ましい実施態様において、チャンバーを開けるための装置、ブロックの温度、ピストンの位置、そしてバルブは、全てコンピュータ制御下にある。本発明の1つの実施態様において、センサー(106)は、CCDカメラ、およびそのピストンの透明部分の後ろの光源である。この実施態様において、1つ以上の液滴のサイズは、液滴を画像化して、液滴画像と参照スポットの画像を比較することにより、連続的に測定される。露点は、液滴のサイズをモニターすることにより推定され、そして圧力は、その液滴の当初のサイズを維持するように調整される。圧力は、ピストンの位置を制御することにより制御される。本発明の別の実施態様において、圧力は従来のセンサーを用いてモニターされる。この実施態様において、圧力は、サンプルの温度およびサンプルの組成に基づき事前に設定された値に変化して、予測された露点範囲内に属する。

【0044】

本発明の好ましい実施態様において、水蒸気の供給源(107)は、一定の温度に保たれた水分飽和フィルターを通過する乾燥ガスの供給源からなる。蒸気供給源から流れるこのガスは、水分で飽和され、そして温度が制御されている。このガスは、チャンバーがシールされる前にそのチャンバー内を置換するために使用され、そしてそのチャンバー内の雰囲気組成が一貫していることを確実にするため、および平衡に達するためにサンプルからのエバポレーションを必要とするために役立つ。

【0045】

吸収および蛍光発光波長および強度によって最も直接的に同定および定量され得る。適切な波長の光源を使用する顕微鏡/カメラ装置が、蛍光標識の検出に都合のよい手段である。放射性標識は、標準的なオートラジオグラフィ、ホスホイメージング分析またはCCD検出器によって可視化され得る。他の検出系が、利用可能であり、そして当該分野において公知である。バイオチン、放射性、蛍光のような標識について、一度に検出されうる異なる反応の数は、限られている。例えば、4つの蛍光分子(例えば、DNA配列決定分析において一般に使用される)の使用は、分析を、一度に4つのサンプルに対して限定する。本質的に、この限定のために、これらの検出器方法を使用する場合、各反応は、個別に評価されなければならない。

【0049】

より有利な検出方法は、サンプル反応物を少なくとも1つのアレイにブールして、産物の同時分析を可能にする。各反応において異なる分子量または他の物理的性質を有するタグを使用することにより、反応産物の粗全体がともに収集され、そして分析され得る。(例えば、米国特許出願第08/786,835号、同第08/786,834号、同第08/787,521号、同第08/898,180号、同第08/898,564号、同第08/898,501号、ならびに、国際公開第97/27331号、同第97/27325号、および同第97/27327号を参照のこと。これら全ては、その全体において、本明細書中で参考として援用される。)手短には、「タグ」分子は、標識として使用される。本明細書において使用する場合、「タグ」とは、「目的の分子」を独自に同定するために使用される化学部分をいい、そしてより具体的には、タグ可変成分、ならびに任意のタグ反応物、タグ成分およびタグ部分において、どんなものであっても、それに最も近接して結合し得るものをいう。

【0050】

本発明において有用なタグは、いくつかの性質を有する：(1)他の全てのタグから区別され得る。他の化学部分からのこの区別は、タグのクロマトグラフィ挙動(特に切断反応後)、その分光学的または電位差測定での特性、あるいはそのいくつかの組み合わせに基づき得る。タグが有用に区別される分光学的方法

(111. 反応産物の検出)

反応産物は、種々の方法で検出され得る。好ましくは、反応成分の1つは、標識される。増幅反応においては、オリゴヌクレオチドプライマーまたはヌクレオチドが、都合よく標識される。好ましくは、プライマーが標識を含有する。単一ヌクレオチド伸長アッセイにおいては、付加されたヌクレオチドが、一般的に標識され、オリゴヌクレオチド連結アッセイにおいては、1つ以上のオリゴヌクレオチドが標識され、他の合成反応においては、プライマーまたはヌクレオチドのいずれかが、代表的に標識される。

【0046】

一般的に使用される標識としては、バイオチン、蛍光分子、放射性分子、色素生産性物質、化学発光剤などが挙げられるが、これらに限定されない。核酸のバイオチン化のための方法は、蛍光分子および放射性分子のオリゴヌクレオチドおよびヌクレオチドへの導入方法と同様に、当該分野において周知である。

【0047】

バイオチンが使用される場合、バイオチンは、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)または放射性標識(例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{33}P)のような検出可能なマーカーと結合体化された、アビジン、ストレプトアビジンなどによって検出される。酵素結合体は、例えば、Vector Laboratories (Burlingame, CA) から市販されている。ストレプトアビジンは、高親和性でバイオチンと結合し、結合しないストレプトアビジンは、洗浄除去され、そして次に西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素の存在が、ペルオキシドおよび適切な緩衝液の存在下において沈殿する差質を用いて検出される。その産物は、可視光線供給源およびCCDカメラを備えた顕微鏡を使用して検出され得る(Princeton Instruments, Princeton, NJ)。そのような機器を用いて、一度に約10,000 $\mu\text{M} \times 10,000 \mu\text{M}$ の画像がスキャンされ得る。

【0048】

検出方法は、蛍光標識、放射性標識、化学発光標識、色素生産性標識、ならびに他の一般に使用される標識について周知である。手短には、蛍光標識は、その

としては、質量分析法(MS)、赤外(IR)、紫外(UV)、および蛍光が挙げられ、MS、IRおよびUVが好ましく、そしてMSは最も好ましい分光学的方法である。電位差測定の電流測定方法は、好ましい電位差測定方法である。(2) タグは、10⁻²²~10⁻⁶モル存在する場合、検出され得る。(3) タグは、化学的なハンドル(このハンドルを介して、タグは、タグが独自に同定することが意図されるMOIに結合され得る)を有する。結合は、MOIに対して直接的にか、または「リンカー」基を介して間接的になされ得る。(4) タグは、それが供される全ての操作(MOIへの結合およびMOIからの切断、ならびにタグがそれに結合している間の、MOIの任意の操作を含む)に対して、化学的に安定である。(5) タグは、そのタグが結合している間、MOI上で行われる操作を有意には妨げない。例えば、タグがオリゴヌクレオチドに結合している場合、そのタグは、オリゴヌクレオチド上で行われる任意のハイブリダイゼーションまたは酵素反応(例えば、増幅反応)を有意に妨げてはならない。

【0051】

特定の分光学的または電位差測定方法によって検出されることが意図されるタグ部分は、その方法による感度および検出特異性を増強する特性を有するべきである。代表的には、そのタグ部分は、それらの特性がタグ部分の主要な部分を代表的に構成するタグ可変成分中に設計されていることによって、それらの特性を有する。以下の議論において、用語「タグ」の使用とは、代表的にタグ部分をいう(すなわち、タグ可変成分を含む切断産物)が、タグ可変成分自体をいうこともまた考慮され得る。なぜなら、それは代表的に独自の検出可能な特性を提供する原因であるタグ部分の一部分であるからである。式T-L-Xの化合物において、「T」部分は、そのタグ可変成分を含有する。そのタグ可変成分が、例えば、質量スペクトロスコピーによって特徴づけられるように設計されている場合、T-L-Xの「T」部分は、T₀と称され得る。同様に、Tを含むT-L-X由来の切断産物は、T₀含有部分と称され得る。以下の分光学的および電位差測定方法は、T₀含有部分を特徴づけるために使用され得る。

【0052】

従って、本発明の1つの局面の中で、核酸分子またはフラグメントの同一性を

決定するための方法（または選択された核酸分子またはフラグメントの存在を検出するための方法）が提供される。この方法は、以下の工程を包含する、(a) 1つ以上の選択された標的核酸分子からタグ化された核酸分子を生成する工程であって、ここでタグは、特定の核酸分子と相関して、そして非蛍光分光測定または電位差測定によって検出可能である、工程、(b) 標識された分子をサイズによって分離し（例えば、HPLC、電気泳動）、酵素的に生成された産物において取り込まれていない標識物質を取り除く工程、(c) そのタグを、そのタグ化分子から切断する工程、および(d) そのタグを、非蛍光分光測定または電位差測定によって検出し、そしてそれにより核酸分子の同一性を決定する工程。そのような技術の例としては、例えば、質量分析法、赤外分光測定法、定電位電流測定法またはUV分光測定法が挙げられる。

【0053】

(IV. 使用)

上記のように、本明細書に記載されるこの方法は、種々の方法において使用され得る。例えば、鋳型核酸の増幅は、個人の遺伝子型決定、変異のスクリーニング、発現プロファイルの決定、などのために使用され得る。オリゴヌクレオチド連結アッセイおよび単一ヌクレオチド伸長アッセイは、変異分析、サンプル中の核酸の検出などのために使用され得る。これらの使用の各々を、以下に手短かに記載する。

【0054】

(A. 遺伝子型決定)

本発明の1つの好ましい局面において、選択された生物体を遺伝子型決定するための方法が提供され、この方法は、以下の工程を含む、(a) 選択された標的分子からタグ化された核酸分子を生成する工程であって、ここでタグは特定のフラグメントと相関して、そして非蛍光分光測定または電位差測定によって検出され得る、工程、(b) そのタグ化分子を分離する工程、(c) そのタグをそのタグ化分子から切断する工程、そして(d) そのタグを、非蛍光分光測定または電位差測定によって検出し、それによりその生物体の遺伝子型を決定する工程。他の実施態様において、そのタグは蛍光性、放射性などであり得る。

にする染色体特異的マーカーは、連鎖分析のために全ゲノムのスクランを行うことについて報告されている(Daviesら、Nature、371:130、1994)。

【0057】

反復は、ジヌクレオチド反復の周囲の独特の領域に相補的なプライマーを使用して増幅され得る。増幅後に、いくつかの増幅された遺伝子座は、アレイでの捕獲の前に合わせられ得る(多様化)。

【0058】

遺伝子型決定またはDNAフィンガープリンティングは、特定のサンプルからの1組のDNAフラグメントの提示を含む。種々のDNAフィンガープリンティング技術が現在利用可能である(Jeffreysら、Nature、314:67~73、1985; ZabeauおよびVos、欧州特許出願92402629.7.; Vosら、Nuc. Acids Res. 23:4407~4414、1996; Batesら、The Impact of Plant Molecular Genetics、14巻、239~255頁、B. W. S. Sobral編、Birkhauser Publishing)。DNAフィンガープリンティングは、特定のDNAサンプルからの1組のDNAフラグメントの提示を含む。種々のDNAフィンガープリンティング技術が、現在利用可能であり(Jeffriesら、Nature、314:67、1985; WelshおよびMcClelland、Nuc. Acids Res. 19:861、1991)、これらのほとんどは増幅(例えば、PCR)を使用してフラグメントを生成する。DNAフィンガープリンティング手順は、個々の生物体にとって特徴的で再現性のある、異なるフラグメント長の「フィンガープリント」パターンを作製する。これらのフィンガープリントは、非常に密接に関連する生物体(ほぼ同質遺伝子系を含む)でさえも区別するために使用され得る。フラグメント長または配列の変異は、制限部位またはプライマー伸長部位の塩基変化、あるいはDNAフラグメント内の挿入または欠失にまで追跡され得る。

【0059】

どのフィンガープリント技術を使用するかは、適用(例えば、DNA型

【0055】

本発明の別の実施態様において、核酸分子の同一性を決定する方法、または例えば、生物学的サンプルにおいて、DNAフィンガープリンティングの技術を用いて、選択する核酸分子を検出する方法を提供する。手短には、そのような方法は、一般的には、一連のタグ化核酸フラグメントを生成して、その後、そのフラグメントをサイズによって分離する工程を包含する。そのサイズ分離工程は、例えば、ゲル電気泳動(例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動)または好ましくはHPLCによって達成され得る。次に、タグはその分離されたフラグメントから切断されて、次にそのタグは対応する検出技術(例えば、質量分析法、赤外分光測定法、定電位電流測定法またはUV分光測定法)によって検出される。

【0056】

多くのタイプのDNA配列多型性の記載が、ヒトゲノム構造の理解についての根本的な基礎を提供している(Botsteinら、Am. J. Human Genetics 32:314、1980; Donis-Keller、Cell 51:319、1987; Weissenbachら、Nature 359:794)。広範な連鎖地図の枠組みの構築が、これらのDNA多型性の使用により促進され、そして連鎖による疾患遺伝子の位置決めのための現実的な手段を提供している。1塩基変異に加えて、直列反復の長さのバリエーションもまたゲノムにおいて一般的であり、少なくとも数万の分散した多型性部位(遺伝子座と呼ばれる)をともなっている。直列反復多型性の2つの主要な群が存在する：ミニサテライト/代表的な数10塩基対の反復長および数10~数千の全反復単位を有する可変の数の直列反復(VNTR)、ならびに6bpまでの反復長および最大約70bpの全長を有するマイクロサテライト。マイクロサテライトジヌクレオチド反復は、ヒト遺伝子の同定において非常に強力な道具であることが証明されており、非常に多型性であり(Weber、1990、Genomic Analysis、1:159~181、Cold Spring Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY; WeberおよびWong、Hum. Mol. Genetics、2:1123、1993)、そして24までの対立遺伝子を有し得る。高レベルの多様性を可能

決定、DNAマーカーマッピング)および研究中の生物種(例えば、原核生物、植物、動物、ヒト)に依存する。これらの要求を満たす多数のフィンガープリント方法が開発されている。これらとしては、ランダム増幅多型性DNA(RAPD)、DNA増幅フィンガープリンティング(DAF)、および任意に開始(prime)するPCR(AP-PCR)が挙げられる。これらの方法は、全て任意に選択されたPCRプライマーが、以前の配列知識なしで任意のDNAからDNAフラグメントパターンを生成させることによる、ランダムなゲノムDNAのフラグメントの増幅に基づく。生成されたパターンは、増幅プライマーの配列および鋳型DNAの性質に依存する。低いアニーリング温度を使用して、プライマーをDNA上の複数の遺伝子座にアニールさせる。この遺伝子座は、プライマー結合部位が互いに十分近い場合に増幅される。原則として、単一のプライマーがバンドのパターンを生じるために十分である。

【0060】

さらなるDNAフィンガープリンティング技術が記載されており、AFLPと称される(Vosら、Nuc. Acids Res. 23:4407、1995)。AFLP技術は、増幅によるゲノム制限フラグメントの検出に基づき、そして任意の起源または複雑性のDNAに使用され得る。手短には、この技術は、ゲノムDNAの全消化物由来の制限フラグメントの選択的増幅に基づく。この技術は、3つの工程を包含する：1) DNAフラグメントの制限およびその後のオリゴヌクレオチドアダプターの連結、2) 複数組(sets)の制限フラグメントの選択的増幅、3) 増幅フラグメントの分析。制限フラグメントの増幅は、プライマーのアニーリングのための標的部位としての、アダプターおよび制限部位配列を使用して達成される。この選択的増幅は、制限フラグメント中へ伸長するプライマーの使用によって達成され、これはフラグメントにおけるプライマーの伸長物が制限部位に隣接するヌクレオチドにマッチするフラグメントのみを増幅する。従って、この方法は、ヌクレオチド配列の以前の知識なしに、種々の方法(例えば、PAGE、HPLC、または他のタイプの分光測定)によって可視化され得る複数組の制限フラグメントを生じる。この方法はまた、多数の制限フラグメントの同時増幅を可能にする。しかし、フラグメントの数は、検出系の解像度

に依存する。代表的には、50〜100制限フラグメントが増幅され、そして検出される。

【0061】

制限フラグメント長多型性(RFLP)を同定する増幅アプローチは、分離技術と、特異的PCRプライマーと結合したタグの検出を組み合わせる。一般的に、1つのプライマーは、1つの特異的タグを有する。従って、そのタグは、1組のプライマーを喪失、従って所定のDNAフラグメント長を表す。多型性は、ゲル中か、またはゲルから溶出される標識化フラグメントの長さのバリエーションとして検出される。HPLCまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動は、単一反復単位で異なるミニサテライト/VNTR対立遺伝子を区別するのに必要な解像度を、通常生じる。マイクロサテライト多型性の分析は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による、反復のブロックを含むDNAの小フラグメントの増幅、その後の変性ポリアクリルアミドゲルでの増幅されたDNAの電気泳動か、またはHPLCによるDNAフラグメントの分離を含む。その増幅されたDNAは、標識が結合されたプライマーを用いて標識される。プライマーは、新規に合成された鎖中に、鎖伸長によって取り込まれる。プライマーは、反復のブロックに隣接する独特の配列に対して相補的である。

【0062】

タグの使用は、マイクロサテライトを用いた遺伝子型決定において大きな効果をもたらす。手短には、PCRプライマーは、タグを有するように構築され、そしてジ、トリ、またはテトラヌクレオチド反復を増幅するために注意深く選択されたPCR反応において使用される。次に、増幅産物は、HPLCまたはPAGEのような方法によって、サイズに従って分離される。次に、そのDNAフラグメントを、時間的な様式において収集し、そのそれぞれのDNAフラグメントからタグを切断し、そしてサイズ分離工程における内部標準との比較から長さを推定する。対立遺伝子の同定は、その増幅された産物のサイズの参照から行う。

【0063】

遺伝子型決定において、切断可能タグを使用することにより、単一の分離工程

Monk, Lancet 3:532, 1989)。ますます効率的な遺伝子試験によって、健康診断と関連して気道および膀胱からの剝離細胞における、発ガン性変異についてのスクリーニングが可能となり得る(Sidranskyら, Science 252:706, 1991)。また、未知の遺伝子が遺伝性疾患を生じる場合、DNA配列変異をモニターする方法は、遺伝子連鎖分析を介した疾患の遺伝を研究するために有用である。しかし、個々の遺伝子における変異を検出および診断することは、技術的および経済的に難しい問題を引き起こす。いくつかの異なるアプローチが探求されているが、いずれも本当に広範囲の適用のためには十分に効率的でも安価でもない。

【0066】

単一ヌクレオチドに關する変異は、物理的、化学的、または酵素的手段によってサンプルにおいて同定され得る。一般的に、変異検出の方法は、以前には未知であった変異の同定に適切であるスクリーニング技術と、既知の配列変異の検出、識別または定量のために設計される技術とに分類され得る。変異検出のためのいくつかのスクリーニング技術は、野生型および変異型配列由来のミスマッチした相補的DNA鎖のヘテロ2本鎖が、異常な移動挙動を示すという観察に基づいて、開発されている。

【0067】

DNA鎖において変異を検出するための1つの戦略は、正常なヌクレオチドの1つを、修飾されたかまたは標識されたヌクレオチドに置換(合成の間)することによるか、または産物の分子量または他の物理学的パラメータを変更させることによる。野生型配列と比較して、増加したまたは減少したこの修飾されたヌクレオチドの数を有する鎖は、変化した移動度を示す(Naylorら, Lancet 337:635, 1991)。増幅によって生成され、内部ミスマッチを含むヘテロ2本鎖DNA分子はまた、移動度によって、正確にマッチした分子から分離され得(Orita, Genomics 5:874, 1989; Keen, Trends Genet. 7:5, 1991)。このことは限定されたDNAのセグメントに変異が存在することを示す。

【0068】

において複数のサンプルを組み合わせることが可能である。これを行えるために、2つの一般的な方法が存在する。高スループットスクリーニングのための第1の一般的な方法は、個体の大きな群における単一多型性を、検出することである。このシナリオにおいては、単一のまたはネスト化したPCRプライマーの組を使用し、1反応ごとに1つのDNAサンプルタイプを用いて、各増幅を行う。分離工程において組み合わせられ得るサンプルの数は、1検出技術ごとに生成され得る切断可能タグの数に比例する(すなわち、質量スペクトロメータタグについて400〜600)。従って、個体の大きな群におけるいくつかの多型性を同時に同定することが可能である。第2のアプローチは、単一のDNAサンプル上での多数の多型性を同定し得る複数の組のプライマーを使用すること(例えば、個体の遺伝子型決定)である。このアプローチにおいては、単一の増幅反応においてプライマーを組み合わせて、これが異なる配列の増幅産物を生成する。各プライマー対または、ネスト化された組は、特異的な切断可能なタグによってコードされ、特異的なタグを用いてコードされる各増幅されたフラグメントを生じる。その反応を、単一の分離工程において行う。分離工程において組み合わせられ得るサンプルの数は、1つの検出技術ごとに生成され得る切断可能なタグの数に比例する(すなわち、質量スペクトロメータタグについて、400〜600)。

【0064】

(B. 変異検出)

疾患の検出は、予防および処置において、ますます重要である。多因子性疾患のための遺伝子試験を開発するのは困難であるが、200を超える既知のヒトの障害が単一遺伝子における欠損(しばしば、単一のアミノ酸残基の変化)によって生じる(Olsen, Biotechnology: An Industry comes of age, National Academic Press, 1986)。これら変異の多数は、疾患状態を引き起こす変化したアミノ酸を生じる。

【0065】

感受性変異検出技術は、変異スクリーニングについて、驚くべき可能性を提供する。例えば、受精卵の移植の前ですら分析を行える(Holdingおよび

変異はまた、標的配列への短いオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションに対する、その不安定化効果を介して同定され得る(Weimur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 26:227, 1991)。一般的に、この技術、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションは、標的配列の増幅、およびその後の短いオリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションを含む。従って、増幅された産物は、固定化されたオリゴヌクレオチドプローブのアレイに対するそのハイブリダイゼーションパターンを決定することにより、多くの可能な配列変異についてスキャンし得る。別の方法は、3'の最後から2番目の位置で標的配列に対してミスマッチであるオリゴヌクレオチドプライマーが、PCRにおいてプライマーとして作用することにおける減少した能力を示すという性質を利用する。さらなるミスマッチが、3'末端から3番目の位置においてプライマーに取り込まれ得る。これは1つの対立遺伝子変異体に対してハイブリダイズしたプライマーの3つの3'ヌクレオチドにおいて2つのミスマッチ位置を生じる。そして、別の対立遺伝子変異体に対してハイブリダイズした場合、3'末端からの第3の位置における1つのミスマッチを生じる(Newtonら, Nucl. Acids Res. 17:2503, 1989)。1bpミスマッチの増幅に有意に好ましい増幅条件が、選択される。

【0069】

(C. 発現プロフィール/ディファレンシャルディスプレイ)

人類のような哺乳動物は、それらのゲノムに約100,000の異なる遺伝子を有し、それらの内、小さな割合、おそらく15%が任意の個々の細胞で発現している。正常な細胞増殖および分化のプロセス、ならびにガンのような病気で生じる病理的变化は、すべて遺伝子発現における変化によって駆動される。ディファレンシャルディスプレイ技術によって、個々の細胞タイプに特異的な遺伝子の同定が可能になる。

【0070】

本明細書に開示されているように、膨大な遺伝子(1〜2,000)の発現を測定するための高処理量法が提供される。本発明の一つの局面において、選択さ

れた生物学的試料からの遺伝子発現のパターンを分析する方法が提供される。この方法は、(a) 一つ以上のタグ化プライマーを使って生物学的試料からcDNAを増幅する工程であって、ここで、このタグが特定の核酸プローブと相関があり、非蛍光分光測定法または電位差測定法によって検出可能である、工程、(b) 増幅されたフラグメントを分離する工程、(c) タグ化フラグメントからタグを切断する工程、および(d) 非蛍光分光測定法または電位差測定法によりタグを検出し、そしてそのことから生物学的試料の遺伝子発現のパターンを決定する工程を包含する。

【0071】

簡潔には、ディファレンシャルディスプレイにおいてmRNAの3'末端部分は増幅されそしてサイズに基づいて同定される。逆転写のためにポリAテイルの5'境界に結合するように設計されたプライマーを使い、続いて上流の任意配列プライマーでcDNAを増幅して、mRNAのサブ集合が得られる。サイズ分離法(PAGE、HPLCなど)は、目的の2つの生物学的試料間のmRNAの長さまたは量を直接並べて比較することができる。このディファレンシャルディスプレイ法は、複数のプライマーの組み合わせを用いることによって哺乳動物細胞で発現された遺伝子(約10,000~15,000のmRNA種)をすべて可視化する能力を有する。

【0072】

固体基板上のタグベースのディファレンシャルディスプレイによって異なっている発現された遺伝子の特徴付けを行い得る。それは目的の2以上の細胞タイプまたは試料において発現している大半のmRNAが、逆転写およびPCRでmRNAの部分集合から部分的なcDNA配列を増幅することによってゲル上で直接比較され得るという原理に基づいている。簡潔には、3つの1塩基低留オリゴdTプライマーは、目的の細胞または試料由来のmRNAを逆転写および増幅するために一連の任意の13塩基オリゴヌクレオチドと組み合わせて用いられる。15,000の遺伝子の発現をモニターするため、少なくとも9つの異なる任意のプライマーを用いることが好ましい。目的の2つの細胞集団あるいは2つの試料の完全なディファレンシャルディスプレイ分析のためには、少なくとも400の増

される。

【0076】

本発明において、それぞれの(ジ)デオキシヌクレオチドは、特有のタグで標識される。4つの反応混合物中、1つだけがプライマー配列に対してジデオキシターミネーターを付加する。この変異が存在する場合、ジデオキシヌクレオチド上の独特のタグを通じて検出され、そのアイデンティティが確立される。複数の変異が同様に独特のタグでDNAプライマーをタグ化することによって同時に確認され得る。このように、このDNAフラグメントは異なるタグ化(ジ)デオキシターミネーターをそれぞれ含んだ4つの別の反応物中で反応させる。ここで、このタグは特定のジデオキシヌクレオチドと相関し、そして非蛍光測定法または電位差測定法によって検出できる。DNAフラグメントは、例えば、ゲル電気泳動(例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動)または好ましくはHPLCによりサイズに従って分離されるかまたはインサイチュで検出される。そのタグはフラグメントから切断され、それぞれの検出技術(例えば、質量分析法、赤外分光測定法、定電位電流測定法または紫外/可視分光光度法)によって検出される。検出されたタグは、研究中の特定のDNAフラグメントおよび変異ヌクレオチドのアイデンティティと相関付けられ得る。

【0077】

(E. オリゴヌクレオチド連結アッセイ)

Landegrenら(Landegrenら、Science 241:487、1988)によって原著記載されているように、オリゴヌクレオチド連結アッセイ(OLA)は、大変大きくそして複雑なゲノムにおける既知配列の同定に使用される。OLAの原理は、所定のDNA標的に互いに隣接してハイブリダイズしたとき、2つの診断オリゴヌクレオチドを共有結合するリガーゼの能力に基づく。もしプローブの接合点の配列が、完全に塩基対合していなければ、そのプローブはリガーゼによって結合されない。「上流」プローブの3'末端に位置しているときに、可能性のある1塩基対の差異を識別する熱安定リガーゼの能力によって、1塩基の解像度を得る機会が提供される(Barony、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:189、1991)。タグが使用

幅反応が必要とされる。2つの細胞タイプのタグベースのディファレンシャルディスプレイ分析を用いると、少なくとも1,500の増幅反応が、容易で迅速に実行される。

【0073】

(D. 単一ヌクレオチド伸長アッセイ)

プライマー伸長法は核酸鋳型における単一ヌクレオチドの検出に使用され得る(Sokolov、Nucleic Acid Res.、18:3671、1989)。原著に記載されているように、囊胞性線維症遺伝子の既知配列に相補的な30塩基のオリゴヌクレオチドおよび20塩基のオリゴヌクレオチドが単一の標識されたヌクレオチドの存在下で伸長された。この方法は遺伝子内の単一ヌクレオチド変化を正しく同定する能力を有した。この技術は一般的に任意の1塩基変異の検出に適用できる(Kuppuswamyら Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:1143-1147、1991)。

【0074】

簡潔には、この方法は、既知の単一ヌクレオチド多型に近接した標的分子中の配列にハイブリダイズするプライマーに基づいている。本発明の範囲内では、この標的分子は好ましくは固体基板に対して共有結合される。鋳型中の次の塩基が反応混合物中の標識されたヌクレオチドと相補的である場合、プライムされたDNAは、標識されたdNTPまたはddNTPをDNAポリメラーゼが付加する条件に置かれる。遊離した標識されたdNTPまたはddNTPは洗い流され、そして伸長産物が検出される。

【0075】

この技術の変法では、cDNAは、2つの対立遺伝子間で1塩基の相違を含む目的の配列の増幅のための鋳型である。その増幅産物はそれからアレイ上にプリントされる。次いで、増幅された産物はそれぞれ、多型に対して1塩基5'側であるプライマーをアニーリングし、そして1つの標識塩基(普通、ジデオキシヌクレオチド)だけ伸長することによって、各対立遺伝子の存在、欠如、あるいは相対的な量について分析される。正しい塩基がこの反応で利用できる時だけ、取り込みがプライマーの3'末端で起こる。伸長産物はそれから上記のように分析

されたとき、それらはプローブに付着され、プローブは増幅された産物に連結される。OLAの終了後、連結されていないオリゴヌクレオチドは、連結されていないオリゴヌクレオチドは溶解するが連結したオリゴヌクレオチドは溶解しない温度でインキュベートすることによって除かれる。あるいは、フラグメントはサイズに基づいて分けられる。そのタグは切断され、そしてマスマスペクトルで検出される。

【0078】

他の実施態様では、オリゴヌクレオチド連結アッセイは、以下の2つの近接したオリゴヌクレオチドを使用する:「レポーター」プローブ(5'末端でタグ化)および5'-リン酸化/3'タグ化「アンカー」プローブ。この2つのオリゴヌクレオチド(これは、異なるタグが組み込まれている)は、標的DNAとアニーリングされ、そして、完全な相補性があればその2つのプローブはT4 DNAリガーゼによって連結される。一つの実施態様では、この3'のタグはビオチンであり、固定化されたストレプトアビジン上でのビオチン化されたアンカープローブの捕捉および共有結合的に連結したレポータープローブについての分析が、標的配列の存在あるいは不在について試験される。

【0079】

本発明の1つの実施態様において、オリゴヌクレオチド連結アッセイの技術を利用して、例えば、生物学的試料において、核酸分子のアイデンティティを決定するための方法、あるいは選択した核酸分子を検出するための方法が提供される。簡潔には、そのような方法は一般に、標的DNAについて増幅を実行する工程、続いて、5'タグ化したレポーターDNAプローブおよび5'リン酸化/非ビオチン化プローブとハイブリダイズする工程を包含する。その試料はT4 DNAリガーゼとともにインキュベートされる。連結されたプローブを有するDNA鎖は、例えば、好ましくはLCまたはHPLCによって、非連結プローブを有するDNAから分離される。このタグは分離されたフラグメントから切断され、次いでそれぞれの検出技術(例えば、質量分析法、赤外分光光度法、定電位電流測定法または紫外/可視分光光度法)で検出される。

【0080】

本発明において、複数の試料および複数の変異は同時に分析され得る。簡潔には、その方法は、目的の変異を含む遺伝子フラグメントを増幅する工程から成る。その増幅された産物は、次いで共通のまたは2つの対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブ（一方は変異を含むが、他方は含まない）とハイブリダイズし、その結果、対立遺伝子特異的なプローブの3'末端は、共通のプローブの5'末端にすぐ隣接する。このことによってそれぞれの遺伝子座で2つの対立遺伝子プローブと共通プローブとの間で融合的なハイブリダイゼーション-連結プロセスが組み立てられている。その共通プローブは4つの蛍光団の一つで標識されており、そして対立遺伝子特異的なプローブはそれぞれ、サイズの相違を提供する1つ以上のタグで標識されている。この試料は、次いで、改変するテイルの長さに基づいて分離され、そして、共通プローブ上の蛍光タグによって検出される。その対立遺伝子特異的なプローブ上のサイズの相違、およびその共通プローブについて使用可能な4つの蛍光団の利用を通じて、多くの試料は分析され得る。

【0081】

本発明の1つの実施態様において、同時の複数の試料の検出のオリゴヌクレオチド連結アッセイの技術を利用して、例えば、生物学的試料において、核酸分子のアイデンティティを決定する、または選択する核酸分子を検出する方法が提供される。簡潔には、そのような方法は一般に、模範DNAを増幅する工程、続いて共通プローブ（非タグ化）および本発明の明細書に従ってタグ化された2つの対立遺伝子特異的なプローブとハイブリダイズさせる工程を包含する。この試料はDNAリガーゼと共にインキュベートされ、フラグメントが、例えば好ましくはLCまたはHPLCによって分離される。そのタグは、この分離されたフラグメントから切断され、次いでそれぞれの検出技術（例えば、質量分析法、赤外分光光度法、定電位電流測定法および紫外/可視分光光度法）によって検出される。

【0082】

(F. 他のアッセイ)

本明細書に記載された方法はまた、ウイルスまたは微生物の遺伝子型決定または同定に対しても利用され得る。例えば、F+ RNA コリファージは、腸ウイルス汚染の指標として有用な候補であり得る。核酸の増幅およびハイブリダイ

ゼーション法による遺伝子型の決定は、信頼でき、早く、単純であり、そして高価でない、血清型決定の代替である（Kafatosら *Nucleic Acids Res.* 7:1541, 1979）。増幅技術および核酸のハイブリダイゼーション技術は、大腸菌（Feng, Mol. Cell Probes 7:151, 1993）、ロタウイルス（Selhabutrら *J. Med. Virol.* 37:192, 1992）、C型肝炎ウイルス（Stuyverら, *J. Gen. Virol.* 74:1093, 1993）および単純ヘルペスウイルス（Matsumotoら, *J. Virol. Methods* 40:119, 1992）を含む様々な微生物を分類するために首尾よく利用されつつけている。

【0083】

遺伝子変異が様々な実験哺乳動物新生物およびヒト新生物で記載されており、そして、発ガン現象で観察される形態学的変化の統一的な形態的な基礎を示す（Vogelsteinら, *NEJM* 319:525, 1988）。近年、分子生物学技術の到来と共に、特定染色体上の対立遺伝子の欠如または腫瘍抑制遺伝子の変異およびいくつかのガン遺伝子（例えば、c-myc, c-junおよびrasファミリー）における変異が観察されている。例えば、K-ras ガン遺伝子中の特定の型の点変異と結腸直腸ガン腫における診断のステージとの間の相関が同定されている（Finkelsteinら, *Arch Surg.* 128:526, 1993）。このように、変異分析は、転移のパターンおよび拡散を含む、腫瘍の攻撃性に関する重要な情報を提供し得る。実際、結腸の第3期ガン腫におけるTP53およびK-ras-2変異分析の予後の値が示されている（Pricoloら, *Am. J. Surg.* 171:41, 1996）。したがって、腫瘍および前ガン状態細胞の遺伝子型決定、および特定の変異の検出は、ヒトにおけるガンの処置においてますます重要になる。

【0084】

以下の実施例は、例示の方法として提供され、限定ではない。

【0085】

【実施例】

（実施例1：市販のスプリングプローブ（spring probe）からのアレイ化チップ（arraying tip）の調製）

この実施例は、アレイに沈着することにおける試料の使用のための、スプリングプローブチップの製造および改変を記載している。

【0086】

XP54Pスプリングプローブは、Osby-Barton（Everett Charlesの1部門（Pomona, CA））から購入する。このプローブを、超微細ダイヤモンド鋭利ストーンの上の「チップダウン（tip-down）」に配置し、そして緩やかな圧力で約0.5cm、その石の上を移動させた。顕微鏡で観察して、金属の約0.005インチ（0.001~0.01インチ）をチップの末端から取り除く。このチップ末端を皮細片を横切ってチップをこすることにより磨き、次いで水で洗浄した。チップは乾燥して保存されるかまたは-20℃で50%グリセロール中で保存される。アレイの調製における使用のために、このチップを、アレイの様式で頭部に取り付ける。この頭部を2軸で制御し得る動作を所有するロボットアームに取り付ける。

【0087】

（実施例2：ガラススライド上のマイクロスフェアのアレイの調製）

ガラススライド上で容易に検出されるマイクロスフェアの沈着は、アレイ形成の再現性を示している。この方法では、56%グリセロール、0.01M Tris, pH 7.2, 5mM EDTA, 0.01% サルコシルおよび1% v/v Fluoresbrite Plain 0.5μM マイクロスフェア（2.5% 固体ラテックス）（Polysciences, Warrington, PA）からなる溶液が調製される。アレイ針を5秒間、この溶液に5mm浸漬する。次いでマイクロスフェアをガラススライド上に繰り返し並べる。スライドの顕微鏡写真は蛍光用のフィルターを用いて蛍光光下で撮影する。図1は、このアレイの各領域に沈着された溶液の量が非常に一致していることを示す。さらに、少なくとも100の沈着物がピックアップ当たりに作製され得、これらは実質的に同一である。

【0088】

（実施例3：修飾された親水性スプリングプローブを用いたアレイ調製）

試料のピックアップ、移入およびミクロ小滴沈着は、親水性の表面を有する液体移入デバイスを用いるとき、特にこのデバイスが修飾されたスプリングプローブであるとき大いに高められる。プローブの表面を修飾するために作用する化学薬剤の使用によるか、または親水性物質を用いたプローブのコーティングによりスプリングプローブは親水性となる。好ましい方法では、スプリングプローブのチップは、25~200mMの1,4-ジチオスレイトール溶液、0.1M ホウ酸ナトリウム中に15分~2時間浸される。ジチオスレイトールは、チオール金の配位により金表面と反応し、これは、その表面を本質的に水酸化し、それを親水性にする。

【0089】

アレイ化溶液は、56%グリセロールおよび食用青で着色した44%の水から成っている。アレイ化チップをアレイ化溶液中に2秒間5mm浸す。次いで、グリセロールを支持するチップをロボットにより制御して、シリコンウエハ上に12×6グリッド中72の微小スポットをプリントする。生成されたスポットは、直径が約100~150ミクロンで、スポット間の間隔は中央から中央まで200ミクロンである。図2は生成されたグリッドのCCDカメライメージを示す。スポット直径の標準偏差は約15%である。

【0090】

（実施例4：アレイオリゴヌクレオチドの比色検出）

鋳型オリゴヌクレオチド（0.5μg/μlの75μl）（5'-ヘキシルアミンGTCACTCTCCT-GCTTGCTGATCCACATCTG-3'）を室温で30分間、20μlの1Mホウ酸ナトリウム中で5μlの20mg/ml 塩化シアヌルと反応させる。この反応から、アレイ化溶液が作製され、56% グリセロール、56ng/μl オリゴヌクレオチド、0.06mM ホウ酸ナトリウムおよび0.3mg/ml 塩化シアヌルからなる。このアレイ化チップを2秒間アレイ化溶液に5mm浸す。次いで、この溶液を保持するチップをロボットにより制御して、ポリエチレンイミン（PEI）をコートしたシリコンウエハに、12×6グリッド中72の微小スポットをプリントする。生成さ

れたスポットは、直径が約100～150ミクロンで、スポット間の間隔は中央から中央まで200ミクロンである。アレイ化の後、ウエハの未反応のPEI部位を15分間100%のn-メチルピロリドン中の100mg/ml コハク酸無水物でブロックし、水で3回洗浄する。未反応塩化シアヌル部位は、15分間、0.01M Tris中の0.1M グリシンでブロックし、Tens緩衝液(0.1M NaCl、0.1% SDS、0.01M Tris、5mM EDTA)で4回洗浄する。次いで、鎖型オリゴマーをそのビオチン化した相補体(5' ビオチン-TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATG-3')と20分間37℃でハイブリダイズさせ、次いで、6XTenおよび2XOHS(0.06M Tris、2mM EDTA、5XDenhardt溶液、6XSSC(3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム、pH7.0)、3.68mM N-ラウロイルサルコシン、0.005% NP-40)で洗浄した。次いで、ウエハを0.5μg/mlのアルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンに、15分間浸し、次いで、2XTens、4XTWS(0.1M NaCl、0.1% Tween 20、0.05M Tris)で洗浄する。次いで、微小スポットをVector Blue(Vector Laboratories, Burlingame, California)(キットのプロトコールに従って)を用いて発達させ、そしてCCDカメラおよび顕微鏡で撮影する。図3は生成された像を示す。得られた微小スポットは、NIH Image(National Institute of Health, Bethesda, MD)によって測定すると直径で約15%の変動および約10%の変動のする強度値を有する。

【0091】

(実施例5:単一のアレイエレメント内の複数オリゴ)

2つの鎖型オリゴ(≠1、5'-ヘキシルアミン-TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATG-3'、≠2、5'-ヘキシルアミン-ACTATGATCAGGCGCGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3')を0.5μg/μlで別々に、5μlの20mg/ml 塩化シアヌルおよび20μlの1M ホウ酸ナトリウムと、室温で30分間、全反応量100μlで

ハイブリダイゼーション後、このウエハを0.5μg/mlの西洋ワサビペルオキシダーゼストレプトアビジン中に15分間浸し、次いで、2XTen、4XTWS(0.1M NaCl、0.1% Tween 20、0.05M Tris)で洗浄する。次いで、この微小スポットを、0.4mg/ml 4-メトキシ-1-ナフトール(0.02%過酸化水素、12%メタノール、PBS)を用いて発達させ、最後に3回水で洗浄する。

【0093】

オリゴ≠1の相補体とハイブリダイズする混合オリゴのセットは、最高濃度のオリゴ≠1を含むグリッドに対して最大の色強度を示し、そして最低濃度のオリゴ≠1を含むグリッドと最小の色強度を示す。その一方、オリゴ≠2の相補体とハイブリダイズする混合オリゴのセットは、最高濃度のオリゴ≠2を含むグリッドに対して最大の色強度を示し、そして最低濃度のオリゴ≠2を含むグリッドと最小の色強度を示す(図4を参照のこと)。

【0094】

【表1】

アレイ化溶液	アレイ化溶液中の オリゴ≠1の濃度 (ng/μl)	アレイ化溶液中の オリゴ≠2の濃度 (ng/μl)
1	56	0.44
2	28	0.88
3	14	1.8
4	7	3.5
5	3.5	7
6	1.8	14
7	0.88	28
8	0.44	56

【0095】

前記から、本発明の具体的な実施形態が例示の目的で本明細書に記載されているが、様々な変更が本発明の思想および範囲を逸脱することなくなされ得ること

反応させる。これらの2つの反応から、アレイ化溶液を56%のグリセロール(glycerol and)で希釈した2つの反応したオリゴの組み合わせから作成する(以下の表を参照のこと)。8つのアレイチップを2秒間、8つのアレイ化溶液の各々に5mm浸す。この溶液を保持するチップをロボットにより制御して、2セットの8つの12X6グリッドをプリントする。各グリッドはポリエチレンイミン(PEI)をコートしたシリコンウエハ上に72の微小スポットを含んでいる。各グリッドは単一アレイ化溶液を表している。この生成されたスポットは、約100～150ミクロンの直径でスポット間の間隔は中央から中央まで200ミクロンである。

【0092】

アレイ化に続いて、ウエハ上の未反応のPEI部位を100% n-メチルピロリドン中の100mg/ml コハク酸無水物で15分間ブロックし、水で3回洗浄する。未反応の塩化シアヌル部位は、0.01M Tris中の0.1Mグリシンで15分間ブロックし、4XTens(0.1M NaCl、0.1% SDS、0.01M Tris、5mM EDTA)で洗浄する。次いで、2回のハイブリダイゼーションを実施する。最初のハイブリダイゼーションでは、1セットの8つのアレイオリゴの組み合わせをオリゴ≠1と相補的であるオリゴヌクレオチド 5'-ビオチン-TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATG-3'とハイブリダイズさせる。第2のハイブリダイゼーションでは、他のセットの8つのアレイオリゴの組み合わせをオリゴ≠2と相補的であるオリゴヌクレオチド(5'-ビオチン-AAAAAAAAAAAAAAAAAGGCGCGCCTGATCAGTAGT)とハイブリダイズさせる。これらのハイブリダイゼーションは、HybriWell Sealing Covers(Research Products International Corporation, Mount Prospect, Illinois)の下で20分間、37℃で同時におこなわれ、続いて、6XTens、2XOHS(0.06M Tris、2mM EDTA、5XDenhardt溶液、6XSSC(3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム、pH7.0)、3.68mM N-ラウロイルサルコシン、0.005% NP-40)で洗浄する。

が理解される。従って、本発明は、添付の請求の範囲によることを除いて制限されない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、可視光照射(上のパネル)および蛍光照射(下のパネル)下で撮影されたアレイ化したマイクロスフェアの顕微鏡写真を示す。

【図2】

図2は、本発明の方法論を使用してロボットにより生成したアレイのCCDカメラ画像を示し、このドメインは平均直径が約100～150ミクロンであり、各スポットの中心と中心との間隔は200ミクロンある。このスポット直径の標準偏差は約15%である。

【図3】

図3は、本発明に従って調製し、ベクターブルー(Vector Blue)(Vector Laboratories, Burlingame, California)を使用して発色し、そしてCCDカメラおよび顕微鏡を用いて画像化したマイクロスポット(microspot)のアレイを示す。

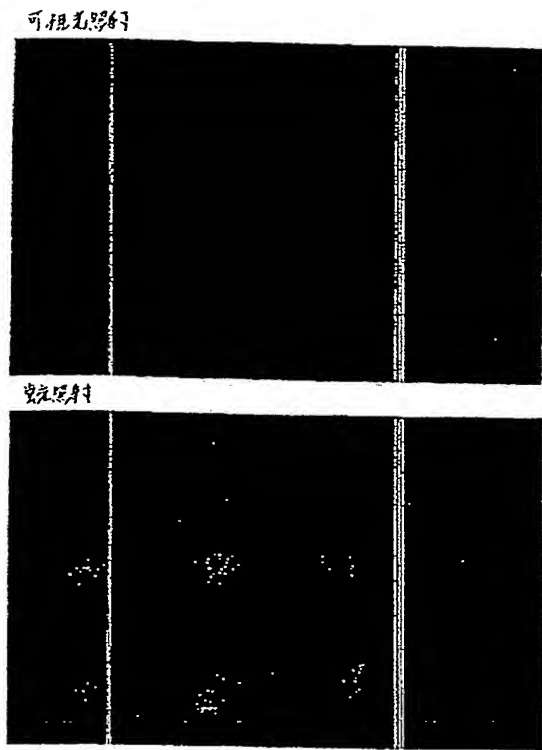
【図4】

図4は、2つの異なるオリゴヌクレオチド(共に単一のアレイエレメント内に存在する)が、本発明に従って同定および部分的に定量され得る方法を示す図である。

【図5】

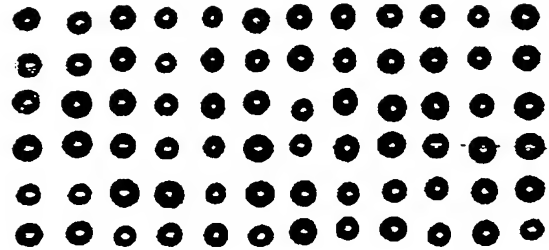
図5は、露点を制御する装置の図である。

【図1】



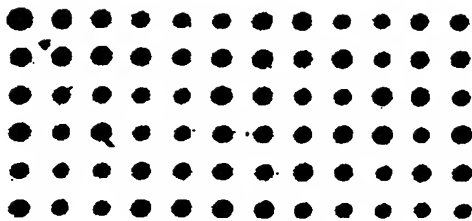
【図2】

FIGURE 2



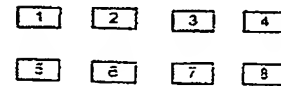
【図3】

FIGURE 3



【図4】

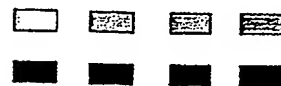
紫外光線透過率の測定
(紫外光線透過率測定)



紫外光線透過率の測定
したときに生じたパターン

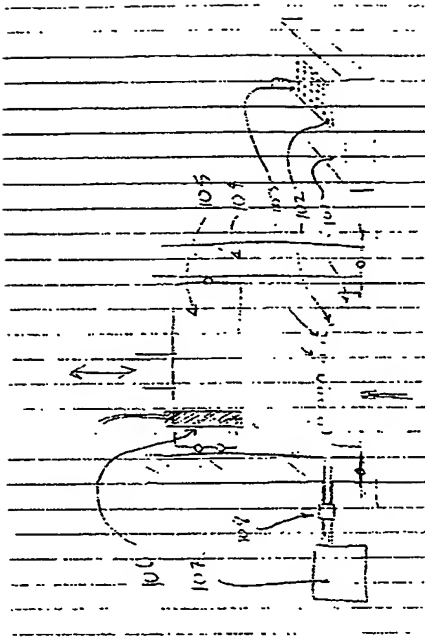


紫外光線透過率の測定
したときに生じたパターン



[25]

FIGURE 5



フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU

(72)発明者 モイニハン, クリステン
アメリカ合衆国 ワシントン 98105,
シアトル, 9ティーエイチ アベニュー
エヌ.イー. 5026

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA20 HA08
HA11 HA14
4B063 QA01 QQ42 QR08 QR31 QR46
QR62 QR66 QR84 QS02 QS24
QS34 QX01 QX04 QX05

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 98/15042		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C1201/68 C1203/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 29484 A (IMAGEN INC) 22 December 1994	1-24
Y	see claims	25, 26
X	WO 91 07505 A (DYNAL AS) 30 May 1991 see figure 2	1
X	WO 95 20679 A (HYBRIDON INC) 3 August 1995 see claims	27
X	WO 96 04404 A (MOSAIC TECHNOLOGIES INC; WHITEHEAD FOR BIOMEDICAL RESEA (US); ADAM) 15 February 1996 see the whole document	29-31
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 13 November 1998		Date of mailing of the international search report 20/11/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl Fax (+31-70) 340-3010		Authorized officer Müller, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No
PCT/US 98/15042

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 93 19207 A (GENE TEC CORP) 30 September 1993	32-37
Y	see whole document, esp. claims	25,26,28
Y	WO 96 31622 A (ISIS INNOVATION ;SOUTHERN EDWIN MELLOR (GB); PRITCHARD CLARE ELIZA) 10 October 1996 see claims and figures	28
A	WO 95 33073 A (TEPNEL MEDICAL LTD ;MINTER STEPHEN JOHN (GB)) 7 December 1995 see claims	1
A	WO 90 13666 A (AMERSHAM INT PLC) 15 November 1990	28

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/15042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429484 A	22-12-1994	AT 165118 T AU 690124 B AU 7106794 A DE 69409646 D DE 69409646 T DK 702728 T EP 0702728 A ES 2114692 T JP 8511425 T US 5545540 A	15-05-1998 23-04-1998 03-01-1995 20-05-1998 05-08-1998 02-06-1998 27-03-1996 01-06-1998 03-12-1996 13-08-1996
WO 9107505 A	30-05-1991	AT 106949 T AU 645045 B AU 6740390 A CA 2066663 A DE 69009774 D DE 69009774 T EP 0502011 A JP 5501498 T US 5525493 A	15-06-1994 06-01-1994 13-06-1991 22-05-1991 14-07-1994 27-10-1994 09-09-1992 25-03-1993 11-06-1996
WO 9520679 A	03-08-1995	AU 1608095 A CA 2180723 A EP 0734457 A JP 9508281 T US 5637464 A	15-08-1995 03-08-1995 02-10-1996 26-08-1997 10-06-1997
WO 9604404 A	15-02-1996	US 5641658 A CA 2196604 A EP 0784701 A JP 10505492 T	24-06-1997 15-02-1996 23-07-1997 02-06-1998
WO 9319207 A	30-09-1993	US 5346672 A US 5281516 A EP 0632839 A US RE35716 E	13-09-1994 25-01-1994 11-01-1995 20-01-1998
WO 9631622 A	10-10-1996	EP 0820524 A	28-01-1998
WO 9533073 A	07-12-1995	AU 2572895 A	21-12-1995

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/15042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9533073 A		CA 2191426 A	07-12-1995
		CN 1152946 A	25-06-1997
		EP 0763135 A	19-03-1997
		FJ 964735 A	27-01-1997
		JP 10500862 T	27-01-1998
		ZA 9504365 A	02-04-1996
WO 9013666 A	15-11-1990	CA 2045505 A	12-11-1990
		EP 0471732 A	26-02-1992
		JP 4505251 T	17-09-1992

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.